

Title	Isolation and characterization of novel O-methyltransferase involved in benzylisoquinoline alkaloids biosynthesis in <i>Eschscholzia californica</i> (Abstract_要旨)
Author(s)	Purwanto
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2017-11-24
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k20780
Right	許諾条件により本文は2018-07-11に公開; Ratmoyo Purwanto, Kentaro Hori, Yasuyuki Yamada, Fumihiko Sato; Unraveling Additional O-Methylation Steps in Benzylisoquinoline Alkaloid Biosynthesis in California Poppy (<i>Eschscholzia californica</i>), Plant and Cell Physiology, Volume 58, Issue 9, 1 September 2017, Pages 1528–1540, https://doi.org/10.1093/pcp/pcx093 ; This is not the published version. Please cite only the published version. この論文は出版社版ではありません。引用の際には出版社版をご確認ご利用ください。
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	Purwanto
論文題目	Isolation and characterization of novel <i>O</i> -methyltransferase involved in benzyloquinoline alkaloids biosynthesis in <i>Eschscholzia californica</i> （ハナビシソウベンジルイソキノリンアルカロイド生合成に関わる新規 <i>O</i> -メチル化酵素の単離と機能解析）		
（論文内容の要旨）			
<p>California poppy (<i>Eschscholzia californica</i>), a member of the Papaveraceae family, produces many kinds of pharmacologically active benzyloquinoline alkaloids (BIAs), such as chelerythrine, sanguinarine, macarpine, and key intermediate reticuline. Among those biological active metabolites, sanguinarine biosynthesis has been well elucidated at the molecular level, whereas chelerythrine and macarpine biosynthesis had been poorly investigated, in which several enzyme-encoding genes were only partially characterized. In this research, applicant isolated and characterized a novel <i>O</i>-methyltransferase (OMT) involved in the biosynthesis of BIA, especially chelerythrine.</p> <p>In Chapter I, applicant searched new OMT candidates using cDNA database of NCBI and PhytoMetaSyn of <i>E. californica</i> based on the conserved OMT domain. Sixty-eight OMT-like sequences were found and then grouped into 22 sequences based on their sequence similarity. Furthermore, after evaluation of their expression in cultured cell lines with different chelerythrine/macarpine profile (S-38 and A5-1 cell lines), three OMT candidates (G2, G3, and G11OMT) were selected. A phylogenetic tree with several known OMTs showed that those three OMTs were in different clades and might have distinct functions in BIA biosynthesis pathway.</p> <p>In Chapter II, recombinant protein of G3OMT was produced in <i>E.coli</i> cells and its enzymological activity to methylate simple benzyloquinoline alkaloids (reticuline and norreticuline) and a protoberberine (scoulerine) was determined. G3OMT methylated reticuline or norreticuline alkaloids at the 7- and 3'- positions and methylated scoulerine at 2- and 9- positions. Whereas sequential dual <i>O</i>-methylation activities for reticuline or scoulerine were reported for PsSOMT1, independent <i>O</i>-methylation at two positions of these substrates was uniquely featured for G3OMT. Because G3OMT showed both reticuline- and scoulerine <i>O</i>-methyltransferase activities, biosynthetic role of G3OMT was further characterized using transgenic <i>Pichia</i> cells expressing G3OMT and other biosynthetic enzyme-encoding genes involved in BIA biosynthesis. Co-culture experiment clearly indicated that G3OMT would function as scoulerine-9-<i>O</i>-methyltransferase in the chelerythrine biosynthesis under <i>in vivo</i> situation. Biotechnological potentials of G3OMT were also discussed.</p>			

(論文審査の結果の要旨)

植物は様々な二次代謝産物を産生するが、特に、含窒素化合物であるアルカロイドは、強い生理活性を有し、医薬品としても用いられるものが多い。アルカロイドのうち、チロシンから合成される一群のイソキノリンアルカロイドは、特に、モルヒネやベルベリン等の有用医薬品を含み、これまでに、その生合成系酵素・遺伝子の同定とともに、代謝工学、あるいは、合成生物学による物質生産系の開発が活発に行われてきた。本論文は、イソキノリンアルカロイド生合成研究のモデル植物であるハナビシソウを用い、その産生するベンゾフェナンスリジン型イソキノリンアルカロイドであるchelerythrineの生合成系に関与するO-メチル化酵素遺伝子(OMT)の単離と同定、さらに、その酵素化学的解析、さらには、生理的役割について解析したものであり、以下のような新規知見をえている。

- 1) ハナビシソウの発現RNAライブラリーを探索し、機能未同定のOMT遺伝子22グループを見出すとともに、アルカロイド組成の異なる2種の培養細胞株を用い、ベンゾフェナンスリジンアルカロイド生合成系に関与すると考えられる未同定のOMT候補遺伝子、G2,G3,G11の3種を特定した。
- 2) これら3種の候補遺伝子の全長cDNAを単離するとともに、その配列比較から、それぞれが独自の活性をもつことを推察し、大腸菌における組換えタンパク質の発現を行い、G3OMTの発現に成功した。
- 3) G3OMTはreticuline 7-OMTと比較的高い相同性をしめしたが、reticulineを基質としたOMT反応の結果、7位のO-メチル化とともに、3'位のO-メチル化を独立して行うこと、さらに、7位、3'位の両メチル化によりlaudanosineも合成できることを明らかにした。
- 4) G3OMTは、reticuline以外に、プロトベルベリン型のscoulerineに対しても活性を示し、9位、ならびに、2位のメチル化を独立して行い、これらのO-メチル化反応によりtetrahydrocolumbamineを合成できることを明らかにした。これまでに、これらの水酸基を同時にメチル化する酵素は報告されておらず、今回が初めての単離例となる。
- 5) G3OMTの酵素化学的解析から、G3OMTは、reticulineよりもscoulerineに対して、高い親和性を示し、scoulerine代謝に関与することが推測された。そのことを実験的に検証するために、合成生物学的手法により、reticulineならびにscoulerine代謝に関与する酵素群を発現したPichia酵母を共培養し、reticulineからchelerythrine生合成の中間体であるN-methylcanadineの生成を実証した。この結果からG3OMTがchelerythrine生合成系で未同定であったscoulerine-OMT(SOMT)であることが示唆された。
- 6) G3OMTとともに、SOMT活性を示す他の酵素の配列を比較し、SOMTが独立して出現してきたことを考察した。

以上、本研究は、これまで未同定であったハナビシソウアルカロイドchelerythrine生合成系の鍵酵素scoulerine 9-O-メチル化酵素(SOMT)を初めて同定するとともに、その進化がイソキノリンアルカロイド生合成植物間において、独立して行われてきたことを示唆する知見を示し、イソキノリンアルカロイド生合成系の植物生理学ならびに、生化学の進展に貢献する独創的成果をえている。また、これらの成果が論理的かつ一貫性をもって記述されるとともに、申請者の幅広い学識と正確に研究を展開する優れた能力が示されている。よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認める。 また、平成29年9月4日 論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。要旨公開可能日： 年 月 日